
자궁경부 액상세포검사의 수기 검사법에 대한 고찰 - SurePath™ 검사법을 준용한 수기 검사법으로 -

성윤검사센터 세포학부 및 경북대학교 의과대학 병리학교실¹

박 종 명 · 장 진 욱 · 임 소 여 · 이 종 기 · 서 인 수¹

= Abstract =

Evaluation of the Manual Method of Liquid-Based Uterine Cervicovaginal Cytology - By The Manual Method Based on SurePath™ Methodology

Jong Myoung Park, M.T., Jin Wook Jang, M.T., So Yeo Lim, M.D.,
Jong Gi Lee, M.D., and In Soo Suh, M.D.¹

Department of Cytopathology, Sung-Yoon Reference Laboratory, Department of Pathology,
Kyungpook University School of Medicine¹, Daegu, Korea

Liquid-Based Uterine Cervicovaginal Cytology is known to be a sensitive and effective screening method for cervical neoplasm. MonoPrep™, ThinPrep™, and SurePath™ methods have been recently used as Liquid-Based Uterine Cervicovaginal Cytology techniques, and the SurePath™ method has been used in Sung-Yoon Reference Laboratory since 2003. The goal of Liquid-Based Uterine Cervicovaginal Cytology is to separate cervical epithelial cells from non-target cells, red blood cells and neutrophils. This report describes a study which evaluated cellularity, stainability, and cellular changes of epithelial cells in samples processed using a manual technique as compared to samples processed using SurePath™ automated method. The samples processed by means of a manual technique contained a cellularity of epithelial cells similar to that of the samples processed using the SurePath™ automated method. In addition, we compared variable density gradient reagents, including dextran, dextrose, and sucrose, to SurePath™ gradient media in order to evaluate cell fractionation and cellularity of epithelial cells. 10% dextran of gradient media shows good fractionation. The samples processed with 10% dextran demonstrated sufficient cellularity of epithelial cells and shows the fewest cellular changes. In conclusion, using a manual technique on these samples is easier to read than those results obtained using the SurePath™ automated method.

Key words : Liquid-Based cytology, Uterine cervix, SurePath™ method, Manual technique, Gradient media

책임저자 : 이 종 기
주 소 : (706-838) 대구광역시 수성구 중동 532-457 성윤검사센터
전 화 : 053-765-2625
팩 스 : 053-766-2624
E-mail address : sylceo@yahoo.co.kr

서 론

액상세포 검사방법은 자궁경부 종양의 효과적인 검사방법으로 알려져 있다. 현재 사용되고 있는 액상세포 검사법으로는 MonoPrep™, ThinPrep™, SurePath™ 검사법이며, 방식은 다르지만 목적은 적혈구, 백혈구 등 관찰 대상이 아닌 불필요한 세포를 제거하고 관찰 대상인 상피세포를 선택적으로 수거하는데 있다.¹⁻⁵ 국내의 경우 고식적 도말법과 자동화 장비를 이용한 방법의 결과를 비교한 연구는 있으나,^{6,7} 액상세포 혹은 수기적 액상세포 방법론에 대한 연구는 드물다. SurePath™ 검사법은 자동화 장비와 gradient media로 SurePath™ 밀도시약 (density reagent)을 사용하여, 상대적으로 비중이 높은 상피세포를 원심분리를 통하여 선택적으로 분리하여 수거하는 방법이다.^{5,8} 본 실험에서는 SurePath™ 검사법을 준용한 수기적 방법을 실시하였으며, 자체 제작한 보존제와 텍스트란, 포도당, 자당 등의 gradient media, 상용되는 피펫, 멀티피펫, 원심분리관, 혈청분리관을 사용하여 수기적 방법으로 제작된 액상세포 슬라이드와 SurePath™ kit 보존제, SurePath™ gradient media, SurePath™ kit 염색시약과 SurePath™ 장비를 사용하여 제작된 액상세포 슬라이드를 비교하여 세포 보존상태, 염색상태, 슬라이드에 부착되는 상피세포 수와 각종 gradient media의 세포분리력을 고찰하는데 목적을 두었다.

재료 및 방법

본 연구에 사용된 재료는 본 검사기관의 의뢰처에 협조를 구하여 자궁질 세포검사를 위하여 채취한 검체를 사용하였다. 이 검체를 이용하여 SurePath™ 장비와 시약을 이용한 방법과 자체 개발한 보존제와 다양한 gradient media를 이용한 수기적 방법으로 각각의 액상세포 슬라이드를 제작하였다. 각각의 방법으로 제작한 슬라이드에서 부착된 상피세포 수, 염색 상태, 세포변화 등을 비교하였고, 수기적 방법에서 사용된 gradient media 종류에 따른 세포분리력을 비교하였다.

SurePath™ 장비와 시약을 사용한 방법에서는 보텍스 교반기를 이용하여 10 ml의 보존제에 담긴 검체 채취용 솔로부터 세포를 탈락시켜 SurePath™ kit 보존액 내에 부유시킨 다음 멀티피펫을 사용하여 15 ml 원심분리관에 SurePath™ 밀도시약 4 ml를 분주하였고,

SurePath™ 장비를 사용하여 보존제 용기로부터 8 ml의 검체를 채취하여 SurePath™ 밀도시약 상층에 분주하였다. 분주된 검체를 1,000 rpm에 2분간 원심분리하여 침사물을 얻었다.

흡인기를 이용하여 상층액 8 ml을 흡인하여 버린 후 나머지 4 ml을 다시 2,000 rpm에 10분간 원심분리하여 원심분리관 바닥에 세포침전물을 형성시키고 상층액 모두를 버린 다음 보텍스 교반기를 이용하여 원심분리관 바닥에 형성된 세포침전물을 원심분리관 바닥으로부터 탈락시켰다. SurePath™ 장비를 사용하여 세포침전물에 1,000 μ l의 tris-buffer를 넣어 세포를 부유시킨 후, 1.3 cm 직경의 ring device가 부착된 슬라이드 위에 SurePath™ 장비를 사용하여 세포부유액 200 μ l를 600 μ l의 tris-buffer와 함께 떨어뜨렸다. Ring device 내의 세포부유액을 10분 이상 방치하여 슬라이드 표면에 세포를 부착시킨 뒤 잔여 세포부유액을 흡인하여 버리고 SurePath™ 염색 kit로 염색하였다. 염색과정은 SurePath™ 장비에서 이루어졌다.

수기적 액상세포 슬라이드 제작방법에서는 자체 제작된 보존제를 사용하였으며, 그 보존제는 24% 에탄올, 메탄올, 이소프로필알코올, sodium azide를 혼합하여 제작하였다. 검체가 담긴 보존제 용기를 보텍스 교반기를 사용하지 않고 테이블에 두드려 세포를 보존액 내에 부유시켰다. 멀티피펫을 사용하여 15 ml 원심분리관에 텍스트란 (5%, 10%, 20%, 50%), 포도당 (5%, 10%, 20%, 50%), 자당 (5%, 10%, 20%, 50%) 등의 gradient media 4 ml를 분주한 뒤, 혈청분리관을 사용하여 검체 8 ml를 각각의 gradient media 상층에 분주하였다. 1,000 rpm에 2분간 원심분리하고 흡인기를 이용하여 상층액 8 ml을 흡인하여 버리고 나머지 4 ml을 다시 200 rpm에 10분간 원심분리하여 원심분리관 바닥에 세포침전물을 형성시킨 후 상층액 모두를 버렸다. 피펫을 사용하여 1,000 μ l의 tris-buffer를 원심분리관에 분주한 뒤 반복적인 피펫 동작으로 세포침전물을 원심분리관 바닥으로부터 탈락시켰다. 피펫을 사용하여 1.3 cm 직경의 ring device가 부착된 슬라이드 위에 세포 부유액 200 μ l를 떨어뜨리고, tris-buffer 600 μ l를 추가하였다. 15분 간 방치 후 tris-buffer 2회, 알코올 (95% 에탄올, 100% 메탄올, 80% 이소프로필알코올 혼합물)로 3회 세척한 후 95% 에탄올에 슬라이드를 고정하였다. 액상세포 슬라이드를 기존의 Papanicolaou 염색을 한 후 검경하였다.

슬라이드 표본에 부착된 상피세포 및 염증세포의

수적 감소 및 증가는 2명의 병리의사가 함께 판독하면서 결정하였으며 일일이 계수기로 헤아리지는 않았다.

결 과

SurePath™ 장비를 사용한 방법과 수기적 슬라이드 제작방법에서 슬라이드에 부착되는 상피세포 수를 비교하였을 때, 검사실에서 상용되는 혈청 분리관과 피펫을 사용한 수기적 방법으로 제작된 슬라이드에서 SurePath™ 장비를 사용한 방법과 비교하여 슬라이드에 부착되는 상피세포 수는 유사하였다 (Fig. 1 & 2). SurePath™ 장비를 사용한 방법에서는 세포부유액 200 μ 를 600 μ 의 tris-buffer와 함께 떨어뜨리게 되는데, 수기적 방법에서 슬라이드에 적하하는 세포부유액의 양을 늘리거나 tris-buffer의 희석배수를 줄일 때 슬라이드 위에 부착된 상피세포 수는 증가하였다.

수기적 방법으로 제작 및 염색한 슬라이드가 SurePath™ 장비를 사용하여 염색한 슬라이드보다 핵 염색성이 충실하고 미세한 핵 염색질 양상이 분명하였다 (Fig. 1). 세포질 염색은 검체에 따라 다양하였지만 SurePath™ 장비를 사용하여 염색한 슬라이드에서는 수기적 방법으로 제작 및 염색한 슬라이드에 비하여 대부분의 상피세포의 세포질 염색이 Wright green 색조를 나타내었다 (Fig. 2).

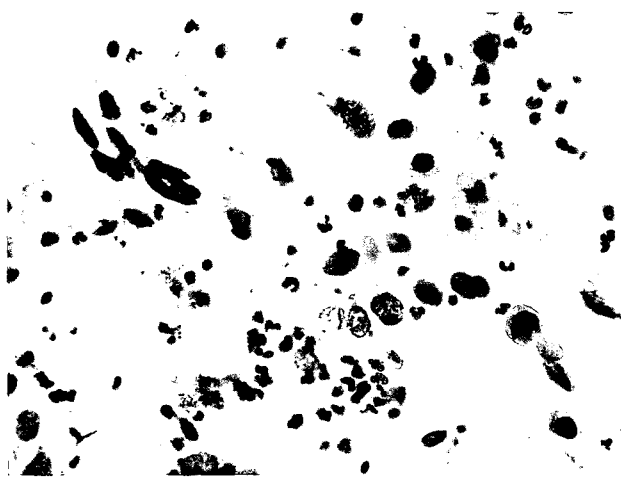


Fig. 1. The slide processed by manual method. The nuclear details, including nuclear chromatin pattern, are more clearly identified in manual method.

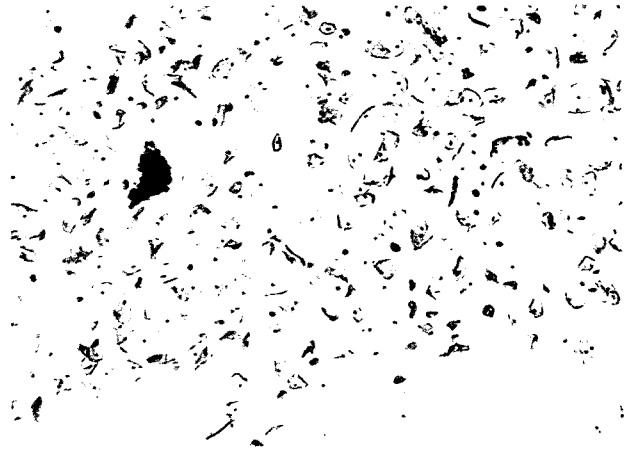


Fig. 2. The slide processed by SurePath™ automated method. The epithelial cells represent Wright green tone.

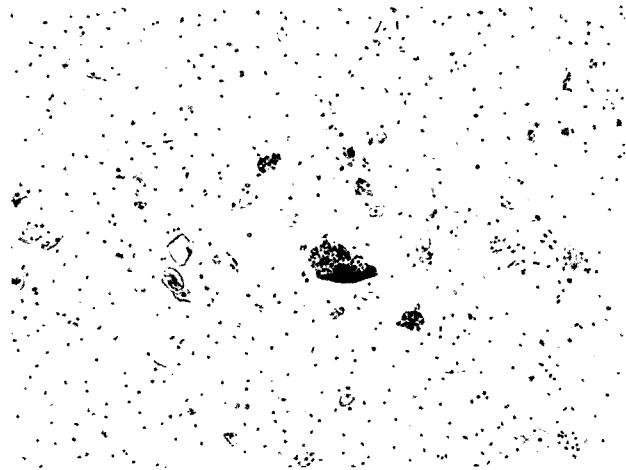


Fig. 3. Endocervical cells processed by manual method. The endocervical cells appear regularly on various gradient media.

Gradient media의 비중 차이를 이용한 세포분리력과 슬라이드에 부착되는 상피세포 수를 비교하였을 때, SurePath™ 밀도시약을 사용하여 제작된 슬라이드와 비교하여 볼 때 10% 텍스트란을 사용하여 제작된 슬라이드에서 염증세포 수가 감소하였으며, 상피세포 수는 유사하였다. 20% 텍스트란과 50% 텍스트란을 사용하여 제작된 슬라이드에서는 SurePath™ 밀도시약을 사용하여 제작된 슬라이드와 비교하여 볼 때 상피세포 수와 염증세포 수가 현저히 감소하였다. 5% 포도당과 10% 포도당이 SurePath™ 밀도시약과 유사한 결과를 보였으며, 20% 포도당과 50% 포도당을 사용하여 제작된 슬라이드에서는 상피세포 수와 염증세포 수가 함께 감소하였다. 10% 자당을 사용하여 제작된

Table 1. Cell fractionation of variable density gradient reagents

Gradient media		Epithelial cells	Neutrophils	Columnar epithelial cells
Dextran	5%	+++	+++	+
	10%	+++	++	+
	20%	++	++	+
	50%	+	+	+
Dextrose	5%	+++	+++	+
	10%	+++	+++	+
	20%	++	++	+
	50%	+	+	+
Sucrose	5%	++++	++++	+
	10%	+++	+++	+
	20%	++	++	+
	50%	+	+	+
SurePath™ gradient media		+++	+++	+

+: Epithelial cells accounts for less than 10,000 per slide, Neutrophils accounts for less than 100 per slide.
 ++: Epithelial cells accounts for 10,000-13,000 per slide, Neutrophils accounts for 100-1,000 per slide.
 +++: Epithelial cells accounts for 13,000-16,000 per slide, Neutrophils accounts for 1,000-5,000 per slide.
 ++++: Epithelial cells accounts for more than 16,000 per slide, Neutrophils accounts for more than 5,000 per slide.

슬라이드와 SurePath™ 밀도시약을 사용하여 제작된 슬라이드에서 염증세포 수와 상피세포 수는 서로 유사하였다. 5% 자당을 사용하여 제작된 슬라이드에서는 SurePath™ 밀도시약을 사용하여 제작된 슬라이드와 비교하여 상피세포 수와 염증세포 수가 함께 증가하였으며, 20% 자당과 50% 자당을 사용하여 제작된 슬라이드에서는 SurePath™ 밀도시약을 사용하여 제작된 슬라이드보다 상피세포 수와 염증세포 수가 현저히 감소하였다. 자궁경관 원주상피세포의 유무는 서로 다른 gradient media의 모든 슬라이드에서 차이는 없었다 (Fig. 3). 각각의 gradient media를 사용하여 제작된 전체 슬라이드 상에 적혈구는 없었다 (Table 1).

자체 제작한 보존제와 SurePath™ kit 보존제를 비교해 본 결과 자체 제작한 보존제를 사용하였을 때 슬라이드에 부착된 상피세포와 염증세포의 경미한 세포 팽창을 보였는데, SurePath™ kit 보존제를 사용한 검

체에서는 이러한 세포팽창 현상을 볼 수 없었다. 이러한 세포팽창 현상은 ring device에 세포부유액을 분주한 후 알코올 수세 단계에서 수세 횟수를 늘릴 때 세포팽창을 막을 수 있었다. 자궁경부 상피세포의 보존 상태, 슬라이드 표면에 부착되는 상피세포 수, 상피세포의 염색 상대는 차이가 없었다.

고 찰

세포 혹은 세포성분의 크기에 따른 분리를 위하여 gradient media로 자당, glycerol, Ficoll, Percoll, Nycodenz 등을 사용할 수 있으며, 그 중에서도 자당과 glycerol이 rate-zonal (size) separation에 흔히 사용이 된다.⁹ 적합한 gradient media의 요건은 세포손상의 최소화, iso-osmotic gradients, 낮은 점도 등을 들 수 있으며, 자당은 비교적 점도가 높은 gradient media이며 40% 이상에서 점도가 급상승한다고 알려져 있다. 액상세포검사의 관찰 대상인 상피세포를 염증세포, 적혈구 등 관찰 대상 세포가 아닌 다른 세포와 분리하기 위하여 gradient media로 10% 텍스트란, 5%와 10% 포도당, 10% 자당을 사용하였을 때 좋은 세포분리력을 보였다. 다당질 중합체 (polysaccharide polymer) 성분인 SurePath™ 밀도시약과 비교하여 볼 때 슬라이드에 부착되는 상피세포 수는 감소하지 않았고, 염증세포의 수는 SurePath™ 밀도시약과 비교하여 볼 때 그 수가 유사하거나 다소 감소하였다. 텍스트란은 다당질 중합체며 점도가 비교적 높은 gradient media로 알려져 있다. 본 실험에서 10% 정도의 저농도 텍스트란을 gradient media로 사용하였는데 SurePath™ 밀도시약과 비교하여 슬라이드에 부착되는 상피세포 수의 감소 없이 염증세포의 경미한 감소를 보였으며 자궁경부 액상세포검사의 가장 좋은 gradient media로 생각된다. 저농도의 포도당과 자당에서 SurePath™ 밀도시약을 사용한 경우와 동일한 상피세포 수, 염증세포 수를 보였는데 텍스트란에 비하여 선별적 염증세포의 감소를 관찰할 수 없었다. 20% 이상 고농도의 자당, 포도당 혹은 텍스트란은 슬라이드에 부착되는 상피세포와 염증세포 수가 모두 감소하였으며, 액상세포검사에서 부적합한 gradient media로 생각된다.

본 액상세포 실험에서 상피세포와 염증세포의 세포 분리력에 기여하는 요소는 gradient media뿐만 아니라 ring device 내 세포 부유액의 세포 침강속도에 있다고

생각된다. 세포 부유액 내에서 상대적으로 비중이 높은 상피세포가 먼저 슬라이드 표면에 부착하게 되고 백혈구는 상피세포 사이의 슬라이드 표면에 부착되거나 상피세포 위에 얹혀 있게 되어 대부분 수세단계에서 씻겨나가게 되고 적혈구는 용혈되거나 상층에 부유하는 것으로 생각된다.

1,000 rpm으로 2분간 원심분리 하였을 경우 염증세포와 적혈구는 검체와 density gradient reagent의 경계 부위 혹은 그 상층에 주로 위치한다고 생각되어 염증세포의 수를 감소시키는 방법으로 5 ml gradient media와 8 ml의 검체를 1,000 rpm으로 2분 원심분리한 후 9 ml의 상층액을 흡인하여 버리는 방법을 시도하였는데 염증세포 수 감소와 아울러 상피세포 수의 미미한 감소도 관찰되었다.

자체 제작한 보존제로 24% 에탄올, 메탄올, 이소프로필알코올, sodium azide의 혼합물을 사용하였다. 정균제인 sodium azide는 보존제 용액에 미생물이 번식하는 것을 방지하기 위하여 사용하였고, 메탄올과 이소프로필알코올은 상피세포의 슬라이드 부착력과 세포고정을 증가시키기 위하여 첨가하였다.

젖산균, 짧은막대균, 칸디다, 트리코모나스 등으로 인하여 상피세포 변성이 심하여 대부분의 상피세포가 슬라이드 표면에서 탈락되는 현상을 보이는 경우가 있었는데, 이때 잔여 세포 부유액을 6 ml의 tris-buffer로 수세한 후 다시 2,000 rpm으로 10분 원심분리하여 상층액을 버리고 세포 부유액을 슬라이드 위에 떨어뜨림으로써 수세 단계에서 상피세포가 슬라이드 표면에서 탈락되는 현상을 막을 수 있었다 (Fig. 4). Tris-buffer에 의한 적정 pH와 변성된 상피세포막의 전기장이 회복되면서 상피세포의 군집현상과 상피세포가 슬라이드 표면에서 탈락되는 현상을 막을 수 있었다고 생각된다.

Lesile 등⁸은 SurePath™ 자동화 액상세포 검사방법에서 수기적 검사방법보다 8.3%의 상피세포 증가를 보였다고 하였으며, 보존제 용기에서 8 ml의 검체를 채취하여 원심분리관에 분주하는 과정만을 수기적 방법으로 하였다. 본 실험에는 전체 과정을 수기적 방법으로 슬라이드를 제작하였으나 상피세포의 감소는 없었다. 세포부유액을 슬라이드 위 ring device에 떨어뜨리는 단계에서 1,000 µl의 tris-buffer로 세포 부유액을 형성시키고 그 세포 부유액 200 ml을 600 ml의 tris-buffer와 함께 떨어뜨리게 되는데, SurePath™의 분주장비를 이용하지 않고 피펫을 이용한 수기적 분주

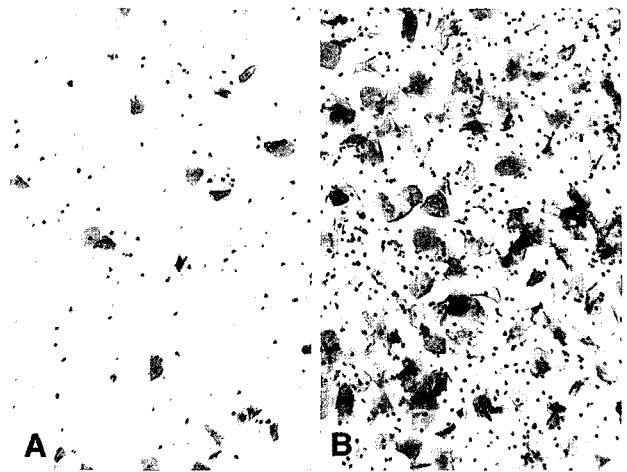


Fig. 4. Comparison of SurePath™ automated method and manual method in inflammatory samples. A) The epithelial cells are frequently detached in SurePath™ automated method. B) The epithelial cells are not detached after tris-buffer washing in manual method.

방법을 사용하면서 슬라이드에 떨어뜨리는 세포 부유액의 양을 늘리거나 tris-buffer의 희석배수를 줄일 때 슬라이드 위에 부착된 상피세포 수가 다소 증가하였다. 이는 세포 부유액의 농도가 높아진 결과로 생각된다.

결 론

24% 에탄올, 메탄올, 이소프로필알코올, sodium azide 혼합물의 자체 제작한 보존제, 10% 텍스트란의 gradient media, 상용되는 멀티피펫, 피펫, 원심분리관, 혈청분리관을 사용하여 수기적 방법으로 제작된 액상세포 슬라이드는 SurePath™ 장비와 시약을 사용하여 제작된 슬라이드와 비교할 때 세포 보존상태와 슬라이드에 부착되는 상피세포 수에 있어 차이는 없었다. 10% 텍스트란은 우수한 세포분리력을 보여 SurePath™ 밀도시약에 비교하여 슬라이드에 부착되는 상피세포의 감소 없이 염증세포 감소를 보였다. 결론적으로 자체 제작한 보존제와 10% 텍스트란의 gradient media를 사용하여 수기적 방법으로 액상세포 슬라이드를 제작하고 슬라이드의 염색을 기존의 Papanicolaou 염색법을 사용하여 수기적 방법으로 시행하였을 때 SurePath™ 자동화 장비를 사용하여 슬라이드를 제작하고 염색한 슬라이드와 비교하여 관독이

더 용이하였다.

참 고 문 헌

1. Hutchinson ML, Agarwal P, Denault T, Berger B, Cibas ES. A new look at cervical cytology. ThinPrep multicenter trial results. *Acta Cytol* 1992;36:499-504.
2. Papillo JL, Zarka MA, St. John TL. Evaluation of the ThinPrep Pap test in clinical practice. A seven-month, 16,314-case experience in northern Vermont. *Acta Cytol* 1998;42:203-8.
3. Austin RM, Ramzy I. Increased detection of epithelial cell abnormalities by liquid-based gynecologic cytology preparations. A review of accumulated data. *Acta Cytol* 1998;42:178-84.
4. Vassilakos P, Saurel J, Rondez R. Direct-to-vial use of the AutoCyte PREP liquid-based preparation for cervical-vaginal specimens in three European laboratories. *Acta Cytol* 1999;43:65-8.
5. Cengel KA, Day SJ, Davis-Devine S, et al. Effectiveness of the SurePath™ liquid-based Pap test in automatic screening and in detection of HSIL. *Diagn Cytopathol* 2003; 29: 250-5.
6. Jang J, Kim J, Cho KJ, Khang SK, Nam JH, Gong G. A comparison of AutoCyte PREP with matched conventional smear in cervicovaginal cytology. *Korean J Cytopathol* 2002; 13: 8-13.
7. Jeon YK, Kim OR, Park KW, Kang SB, Park IA. Liquid-based cytology using MonoPrep™ system in cervicovaginal cytology: Comparative study with conventional Pap smear and histology. *Korean J Cytopathol* 2004; 15:33-9.
8. Lesile R, Rowe C, Marshall J, Benz JS. PREPmate Automated Processor: Comparison of automated and manual methods of liquid-based gynecologic sample preparation, *Diagn Cytopathol* 2002;27:312-5.
9. Rickwood D, Ford TC, Steensgaard J. Compatibilities and properties of density gradient media. In: *Centrifugation*. Rickwood D, Ford TC, Steensgaard J. eds. Singapore: John Wiley & Sons, 1994;35-55.